

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2015～2016
 課題番号：15K19339
 研究課題名(和文)統合的ゲノム・エピゲノム解析による大腸低分化腺癌の分子病態と診断・治療法の開発

 研究課題名(英文)Elucidation of molecular pathology and development of diagnostic and therapeutic methods in poorly differentiated colorectal adenocarcinoma by integrated genome and epigenome analysis

 研究代表者
 青木 敬則 (Aoki, Hironori)

 札幌医科大学・医学部・研究員

 研究者番号：40749496

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸内視鏡治療または外科手術にて切除した大腸腫瘍組織から、高・中分化腺癌と低分化腺癌の組織を採取しDNAおよびRNAを抽出した。抽出したRNAを用いてRNAシーケンスを行い、早期大腸低分化腺癌において発現している遺伝子を複数同定した。
 また、上記で採取した大腸腫瘍を用いて、Infinium HumanMethylation450ビーズアレイによるDNAメチル化解析を行った。その結果、大腸鋸歯状病変の1つである鋸歯状腺腫で高率にメチル化している遺伝子Aを同定した。多数の大腸腫瘍によるパイロシーケンス法でのメチル化解析においても、遺伝子Aのメチル化レベルは鋸歯状腺腫において高かった。

研究成果の概要(英文)：We performed extraction of DNA and RNA using colorectal tumor tissues which were endoscopically and surgically resected. Next we performed RNA sequencing using extracted RNA, and we identified several genes which expressed in early invasive colorectal cancers with poorly differentiated adenocarcinomas.
 We carried out Infinium HumanMethylation 450 BeadChip analysis using extracted DNA. BeadChip analysis revealed gene A in which methylation levels were progressively increased during development of traditional serrated adenomas (TSAs). Methylation analysis of many colorectal lesions by pyrosequencing revealed that gene A is frequently methylated in TSAs.

研究分野：医学

キーワード：大腸低分化腺癌 大腸鋸歯状病変 大腸腫瘍

1. 研究開始当初の背景

大腸低分化腺癌は、高・中分化腺癌と比較し予後不良であることが報告されている。進行が極めて速く、早期癌の段階で発見されることは稀であり、診断時には高度に進行している症例が多い。低分化腺癌の頻度は本邦で2.7-10%、欧米では約20%と報告されており(Chung CK et al. J Surg Oncol 1982)、決して稀な疾患ではない。低分化腺癌の分子機構を解明し、治療標的となる遺伝子の発見、新規治療戦略を構築することは重要な課題である。

2. 研究の目的

大腸低分化腺癌は極めて予後不良の疾患であり、早期診断・治療法の開発が急務である。本研究では、統合的ゲノム・エピゲノム解析により大腸低分化腺癌の分子病態を明らかにし、それを標的とした治療法につながる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体の採取

大腸内視鏡あるいは外科手術にて切除された大腸腫瘍組織から、高・中分化腺癌と低分化腺癌を含めた大腸腫瘍組織のDNAおよびRNAを抽出した。組織が混在している大腸腫瘍はレーザーマイクロダイゼクションにより組織別に採取した。大腸癌においては、高・中分化腺癌と低分化腺癌に分けて採取した。

(2) 大腸腫瘍組織を用いたトランスクリプトーム解析

(1)で採取した早期大腸低分化腺癌2検体、早期大腸高分化腺癌2検体および正常組織2検体を用いて、Illumina TruSeq RNA AccessによるRNAシーケンス解析を行った。

(3) 大腸腫瘍組織を用いたDNAメチローム解析

(1)で採取した大腸腫瘍を用いて、Infinium HumanMethylation450 ビーズアレイによるDNAメチル化解析を行った。

4. 研究成果

(1) 臨床検体の採取

これまで採取してきた約1000検体の大腸腫瘍組織に加え、今回新たに約500検体の大腸腫瘍組織からDNAおよびRNAを抽出した。特に、組織が混在していた約20検体は、レーザーマイクロダイゼクションにより組織別に採取することが可能であった。

(2) 大腸癌組織を用いたRNAシーケンス

早期大腸低分化腺癌2検体、早期大腸高分化腺癌2検体および正常組織2検体を用いたRNAシーケンスを行い、高分化腺癌および正常組織と比較し低分化腺癌において発現に差が見られる4遺伝子を抽出した。現在は

米国のがんゲノムアトラス研究ネットワーク(TCGA: The Cancer Genome Atlas)から得られた遺伝子データを用いて4遺伝子に対し検証中である。今後は、(1)で得られた多数の大腸癌組織を用いて免疫染色や機能解析等を行うことにより、4遺伝子の低分化腺癌との関連性について検証予定である。

(3) 大腸腫瘍組織を用いたDNAメチル化解析
大腸腫瘍7検体を用いたInfinium HumanMethylation450 ビーズアレイによるDNAメチル化解析を行い、大腸鋸歯状病変の1つである鋸歯状腺腫(Traditional Serrated Adenoma, TSA)で高率にメチル化している遺伝子を11個同定した。

次に、大腸腫瘍約600検体を対象に、同定した遺伝子のメチル化をパイロシーケンス法で検証した。パイロシーケンスによるメチル化解析の結果、同定した遺伝子の1つである遺伝子Aのメチル化レベルは、同じ大腸鋸歯状病変である過形成性ポリープまたはSessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)と比較してTSAにおいて高いことが判明した。またTSA癌化例では、SSA/P癌化例と比較して遺伝子Aのメチル化が高い傾向にあった。そこで我々は、遺伝子Aのメチル化レベルとBRAF/KRAS変異およびCpG island methylator phenotype (CIMP)マーカーである5つのメチル化マーカー(MINT1, MINT2, MINT12, MINT31, p16)とMLH1のメチル化レベルとの関連性について検討した。なお、CIMP statusに関しては、5つのメチル化マーカーのうち4マーカー以上陽性をCIMP-high、2または3マーカー陽性をCIMP-low、それ以外をCIMP-negativeと定義した。その結果、KRAS変異とCIMP-lowに正の相関を認めた。

次に我々は、遺伝子Aのメチル化が遺伝子のサイレンシングと関連しているかを検証するため、12種類の大腸癌細胞株(CaCO2, Colo320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, RK0, SW48, SW480, SW620, T84, WiDr)と正常大腸組織を用いて定量RT-PCR解析を行った。正常大腸組織と比較し、全ての大腸癌細胞株で遺伝子Aの発現低下を認めた。また、DNAメチル化酵素阻害剤である5-aza-2'-deoxycytidine処理後の全ての大腸癌細胞株で遺伝子Aの発現回復を認めた。臨床検体においてもTSA, SSA/P, 正常組織を用いて定量RT-PCR解析を行い、TSAでは遺伝子Aの発現低下が見られるが、SSA/Pおよび正常組織では発現低下が見られないことを確認した。

大腸腫瘍における遺伝子Aの機能を検証するため、大腸癌細胞株に遺伝子A発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入し、各種機能解析を行った。Colony formation assayの結果、RK0およびSW480細胞株において遺伝子A過剰発現によるコロニー形成抑制を確認した。Cell viability assayでは、RK0およびSW480細胞株において遺伝子Aによる細胞増殖抑制を確認した。しかし、

migration assay および Matrigel invasion assay の結果、遺伝子 A による大腸癌細胞の浸潤・遊走能への影響は認められなかった。またフローサイトメトリー解析の結果、遺伝子 A による大腸癌細胞のアポトーシス誘導は確認されなかった。

in vivo における遺伝子 A の腫瘍抑制能を確認するため、ヌードマウスを用いて異種移植モデルを作成した。遺伝子 A 発現ベクターを導入した SW480 細胞株において腫瘍形成能の抑制を確認した。

今後は、遺伝子 A の臨床応用を目指して多数例の臨床検体を用いた免疫染色を施行する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sawada T, Yamamoto E, Aoki H(員数 18, 8 番目) et al.

Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations.

Oncotarget. 7: 35106-35118, 2016. 査読あり

DOI:10.18632/oncotarget.9044.

山野 泰穂, 田中 義人, 青木 敬則(員数 17, 16 番目) 他.

大腸鋸歯状病変の診断と臨床的取り扱い.

日本消化器病学会雑誌 112: 676-682, 2015. 査読なし

DOI:10.11405/nisshoshi.112.676.

田中 義人, 山野 泰穂, 青木 敬則(員数 13, 12 番目) 他.

大腸鋸歯状病変に左右差はあるのか局在からみた大腸鋸歯状病変の臨床病理学的, 分子生物学的特徴.

胃と腸 50: 1697-1707, 2015. 査読なし
DOI: 10.11477/mf.1403200494

[学会発表](計9件)

(1) Aoki H et al. Subclasses of Type-II pit pattern reveal alternative tumorigenic pathways of colorectal serrated lesions. 24th UEG Week: 2016 Oct 15-19: Vienna(Austria).

(2) Aoki H et al. Identification of aberrant DNA methylation associated with the development of colorectal traditional serrated adenoma and the possibility for CRC progression marker. ACG2016 Annual scientific meeting & postgraduate course:

2016 Oct 14-19: Las Vegas (USA).

(3) 青木敬則 他. 大腸鋸歯状腺腫の進展に関わる DNA メチル化異常の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会: 2016 年 10 月 6 日-8 日: パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(4) 青木敬則 他. 大腸鋸歯状腺腫においてメチル化異常を示す遺伝子の同定とその検討. 第 27 回日本消化器癌発生学会総会: 2016 年 9 月 15 日-16 日: 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

(5) 青木敬則 他. 大腸鋸歯状腺腫においてメチル化する遺伝子の同定とその検討. 第 37 回日本大腸肛門病学会北海道支部例会: 2016 年 5 月 19 日-20 日: 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・大阪市)

(6) Aoki H et al. Identification of aberrant DNA methylation associated with the development of traditional serrated adenoma. Tenth AACR-JCA joint conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics: 2016 Feb 16-20: Maui (USA).

(7) 青木敬則 他. 鋸歯状腺腫においてメチル化する遺伝子の同定と臨床病理・分子生物学的検討. 第 26 回日本消化器癌発生学会総会: 2015 年 11 月 19 日-20 日: 米子全日空ホテル(鳥取県・米子市)

(8) Aoki H et al. Endoscopic and molecular features reveal progression of serrated lesions. 23th UEG Week: 2015 Oct 24-28: Barcelona (Spain).

(9) 青木敬則 他. 鋸歯状腺腫の発育進展に関わる新規遺伝子のメチル化同定のためのエピジェネティクスおよび臨床的特徴の統合解析. 第 74 回日本癌学会学術総会: 2015 年 10 月 8 日-10 日: 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/biochem2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 敬則 (AOKI, Hironori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 40749496

(2)連携研究者

鈴木 拓 (SUZUKI, Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20381254

山本 英一郎 (YAMAMOTO, Eiichiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60567915

(3)研究協力者

山野 泰穂 (YAMANO, Hiro-o)

菅井 有 (SUGAI, Tamotsu)